

Ultrastrukturvergleich der Epidermisstruktur von terrestrischen (*Pomatias elegans*), Süßwasser- (*Viviparus viviparus*) und marinen (*Steromphala divaricata*) Gastropoden

al Jalali, Leonor; jalalile@hu-berlin.de

Segelitz, Patrick Steven; Patrick.Segelitz@gmx.de

Zusammenfassung

Diese Arbeit sollte durch vergleichende Betrachtung von Gastropodenepithelien Rückschlüsse auf Habitatspezifische Anpassungen ziehen. Hierbei lag der Fokus auf Vorkommen und Dichte von Mikrovilli sowie Zilien und der Abundanz sowie Variabilität von Drüsengeweben.

Die Epithelien der Arten *Pomatias elegans* (terrestrisch), *Viviparus viviparus* (aquatisch) und *Steromphala divaricata* (marin) wurden mittels Licht-, Rasterelektronen- und Transmissionselektronenmikroskopie miteinander verglichen.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Dichte von Mikrovilli bei der Sumpfdeckelschnecke *V. viviparus* größer ausfällt als bei der marinen Schnecke *S. divaricata*. Die Verteilung von Mikrovilli und Zilien variiert bei den betrachteten Arten stark mit der Lokalisierung des Gewebes.

Für *S. divaricata*, konnten fünf unterschiedliche Drüsengewebe beobachtet werden, wohingegen bei *P. elegans* und *V. viviparus* jeweils ein Drüsentyp beobachtet werden konnte.

Der direkte Vergleich des Fußes von *V. viviparus* und *S. divaricata* zeigte einen, das Epithel bedeckenden, Ziliensaum gleicher Dichte sowie eine Ausfüllung des Epithels mit Drüsenzellen ähnlichen Erscheinungsbildes. Dies deutet darauf hin, dass diese Struktur an der ventralen Seite des Fußes eine Anpassung an den mäßig umspülten Lebensraum (Brandungszone bei *S. divaricata*, sowie mäßig fließende Gewässer bei *V. viviparus*) beider Arten darstellt.

Einleitung

Die äußerste Zellschicht von Gastropoden, das Epithel, ist in andauerndem Kontakt mit der Umwelt und erfüllt mannigfaltige Aufgaben. Sie beherbergt Chemo- (Emery 1992) und Mechanorezeptoren (Crisp 2009), dient der Respiration (Graham 2015) sowie der Endozytose (Ryder 1977) und dem Austausch von Metaboliten (Simkiss 1988). Mit der Vielzahl an von Gastropoden bewohnten Habitaten geht auch eine Vielzahl von Umweltbedingungen einher, an die ein Gastropode angepasst sein muss.

Der Sauerstoffgehalt der Umgebung nimmt von Luft mit 260 mg/L zu Süßwasser mit 9,08 mg/L bei 20°C bis zu 7,38-7,60 mg/L bei Meerwasser mit einem Salzgehalt von 3-3,4% bei 20°C ab. Dies bedeutet, dass aquatische Gastropoden Mechanismen entwickeln müssen, um Sauerstoff effizienter aus ihrer Umgebung aufzunehmen, als dies bei terrestrischen Gastropoden der Fall ist. Ein möglicher Anpassungsmechanismus ist

die Vergrößerung der Epitheloberfläche durch Ausstülpungen der Epithelmembran, den sogenannten Mikrovilli. Hinzu kommt eine große Bandbreite in der Salinität der Umgebung, die gerade bei der Betrachtung von marinen Gastropoden bedacht werden sollte. 1981 beschrieb Schlichter, dass sich Ionen im Schleim von *Lymnaea stagnalis appressa* anreichern. Auch wenn es sich bei dieser Art um eine Süßwasserschlamm- und Sumpfschnecke handelt, ist davon auszugehen, dass Schleim eine gewisse Rolle im Ionen- und Salzhaushalt von Gastropoden spielt.

Des Weiteren stellen aquatische Lebensräume durch ihre Strömungsmechaniken zusätzliche Ansprüche an die Lokomotion von Gastropoden denen terrestrisch lebende Gastropoden nicht ausgesetzt sind.

Der Mechanismus der Lokomotion ist hierbei stets ein Anheben und Vorschieben von Teilbereichen des Fußes, bei dem der Fußsaum stets in

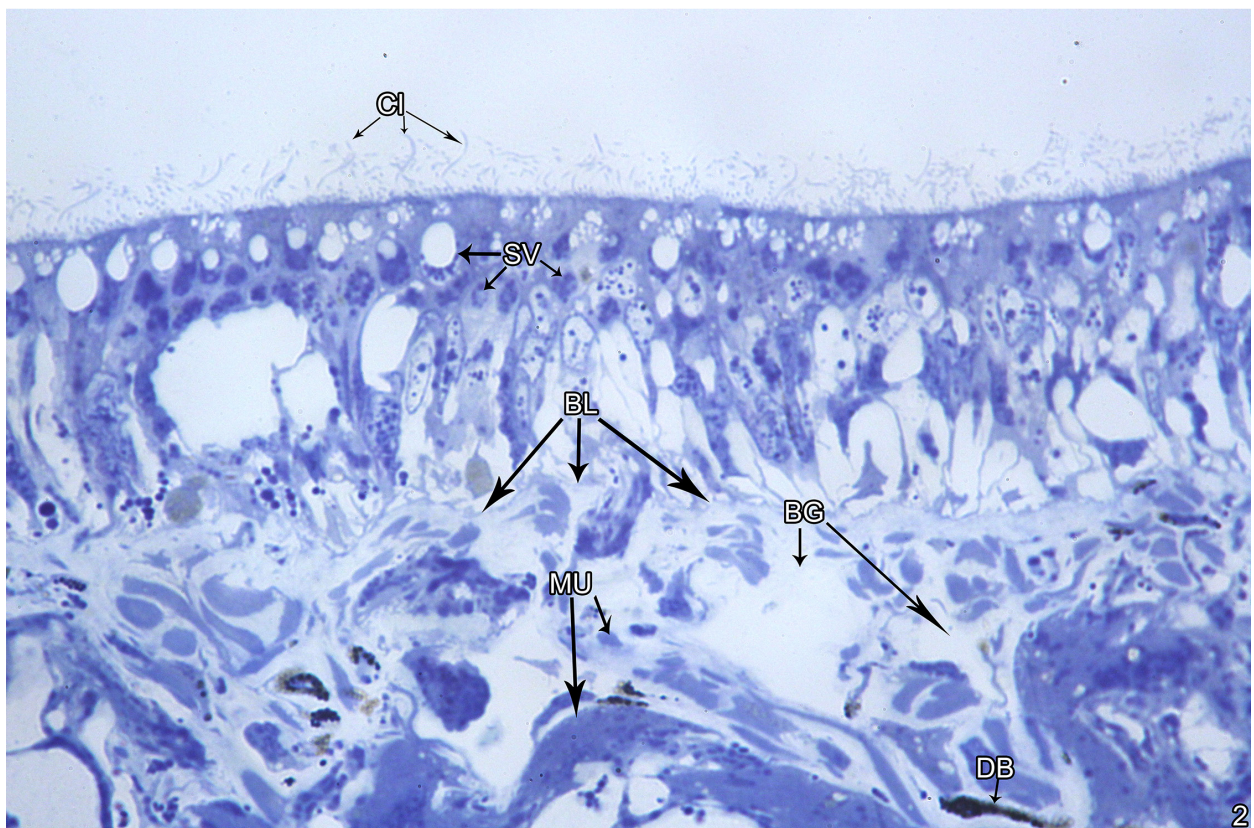
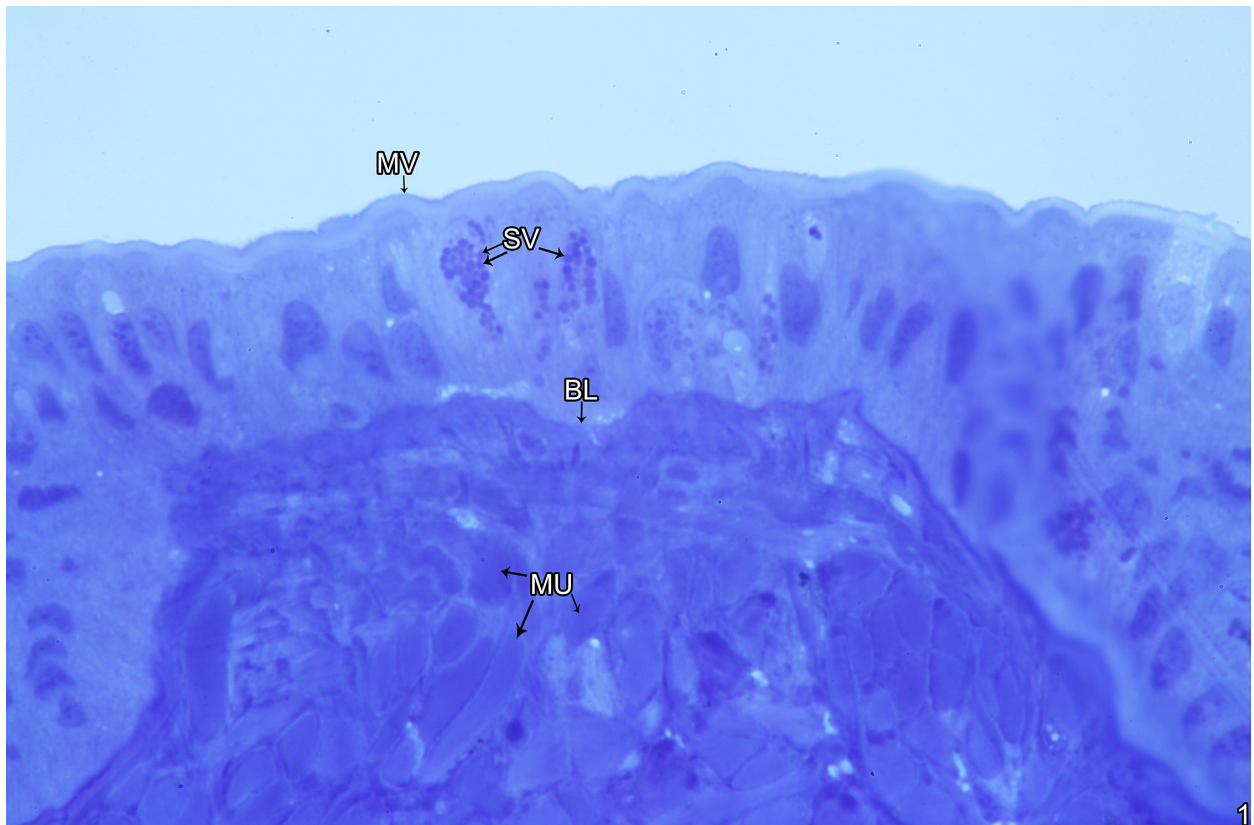


Abb. 1 & 2. Semidünnschnitt von *P. elegans* (1) und dem Fuß von *V. viviparus* (2) angefärbt mit 1% Toluidinblau bei einer Vergrößerung von 1:100. Erkennbar ist die Palisadenstruktur des Epithelgewebes, das zwischen dem Mikrovillisaum (MV) (1) bzw. den Zilien (2) und der Basallamina (BL) liegt. Im Inneren der Zelle sind distinkte, sekretorische Vesikel (SV) zu erkennen. Unterhalb der Basallamina liegt ein dichtes Gewebe aus Muskulatur (MU). „Dense-bodies“ (DB) sind nur bei *V. viviparus* zu beobachten (2).

Kontakt mit dem Substrat bleibt. Dadurch „zieht“ sich ein Gastropode vorwärts. Unterstützt wird dieser Vorgang durch einen ventral am Fuß gelegenen Ziliensaum der abgesonderten Schleim verteilt und zur Bewegung nutzt (Hawkins 1988). Diese motorischen Zilien besitzen wie alle motorischen Zilien von adulten Organismen eine 9x2+2 Struktur, wohingegen sensorische Zilien an dem fehlenden zentralen Mikrotubulipaar erkannt werden können.

Neben der Unterstützung der Lokomotion kann der Schleim der Gastropoden eine Vielzahl weiterer Funktionen erfüllen wie z. B. Reproduktion, Nahrungsaufnahme, Verteidigung und Schmierung (Denny 1983). So hat Von Byern (2017) durch ultrastrukturelle und histochemische Untersuchungen fünf verschiedene Drüsentypen in der Landschnecke *Cepaea hortensis* finden können, während Wondrak 2012 bei Individuen der Gattung *Arion* sechs unterschieden hat. Für marine Arten werden generell mehrere verschiedene Drüsentypen beschrieben. So z. B. sechs Arten in *Acmaea tessulata*, neun bei *Patella vulgata* und zehn in *Littorina irrorata* (Greifstorfer 2017). Hierbei kann sich das Auftreten der einzelnen Drüsentypen lokal stark unterscheiden. Im ventralen Fußbereich von *Acmaea* wurden beispielsweise alle sechs Drüsentypen beschrieben während bei *Littorina* nur drei von neun Drüsentypen beschrieben (Greifstorfer 2017).

Gastropoden-Mucus besteht in der Regel aus Protein-Polysaccharid-Komplexen, welche entweder neutral oder sauer und unterschiedlich geladen sein können. Die Polysaccharide, welche aus verketteten Disacchariden wie bei einem Glycosaminoglykan zusammengesetzt sind, werden in dem Kontext auch als Mucopolysaccharide bezeichnet. Der pH-Wert, die Ladung und das Kohlenhydrat zu Protein Verhältnis entscheiden hierbei über die Funktionalität.

Neben diesen Schleimdrüsen existieren auch Calcium- und Pigmentdrüsen (Barr 1927), die beobachtet werden könnten.

Verglichen werden hier *Pomatias elegans*, *Viviparus viviparus* und *Steromphala divaricata*. *P. elegans* gehört zu den Landdeckelschnecken (Pomatiasidae), benötigt kalkhaltige Böden und ist vergleichsweise wärmebedürftig. Sie ernährt sich von abgestorbener organischer Materie (Wenz 1923). *V. viviparus* gehört zu den Sumpfdeckelschnecken (Viviparidae) und lebt in mäßig

fließenden Gewässern. Zu ihrer Nahrung zählen sowohl Algen als auch Detritus (Glöer 2002). *S. divaricata* gehört zu den Kreiselschnecken (Trochidae), lebt überwiegend im Litoral und ernährt sich als Herbivore ebenfalls von Detritus und Algen (Poutiers 1998).

Es wurde erwartet, dass *P. elegans* als terrestrisch lebender Organismus im Vergleich zu den aquatisch lebenden Vertretern *V. viviparus* und *S. divaricata* eine geringere Mikrovillidichte besitzt, da Austrocknung in terrestrischen Habitaten ein größeres Risiko darstellt als respiratorische Inhibition. Hierbei sollte die Mikrovillidichte von *V. viviparus* zu *S. divaricata* aufgrund der sinkenden Sauerstoffkonzentration im umgebenden Medium weiter zunehmen.

Aufgrund des steigenden Anspruchs an den motorischen Apparat in aquatischem Medium wurde außerdem erwartet, dass *V. viviparus* und *S. divaricata* eine größere Anzahl unterschiedlicher Drüsentypen aufweisen als *P. elegans*. In Übereinstimmung mit Greifstorfer (2017) wurde vor allem im Fuß der Gastropoden mit großen Unterschieden der Drüsenstrukturen gerechnet. Einhergehend mit den aquatischen Lebensräumen und den nur mäßigen Strömungen, denen *V. viviparus* und *S. divaricata* ausgesetzt sind, wurde erwartet, dass diese mehr motorische Zilien aufweisen als *P. elegans*, sich jedoch untereinander nicht unterscheiden.

Material und Methoden

Individuen

Die verwendeten Individuen waren *P. elegans*, *V. viviparus* und *S. divaricata*. *P. elegans* wurde in Kroatien gesammelt, *V. viviparus* wurde im Tegeler Fließ gesammelt und *S. divaricata* wurde im adriatischen Meer gesammelt. Von jeder Art wurde je ein Individuum für die Analyse verwendet.

Probenvorbereitung

Die Gehäuse von *P. elegans* und *S. divaricata* wurden durch vorsichtige, stumpfe Gewalteinwirkung zerbrochen. Nach dem Entfernen des

Gehäuses wurden Teile des Kopfes und Fußes in Stücke mit einer Kantenlänge von ca. 1 cm zerteilt. *V. viviparus* wurde präpariert, indem der Kopf durch Zug am Operculum freigelegt wurde. Hier wurden ebenfalls Schnitte mit einer Kantenlänge von ca. 1 cm angefertigt.

Primärfixierung

Für die Primärfixierung wurde 25% Glutaraldehyd-Lösung (Electron Microscopy Sciences, USA) in destilliertem Wasser und 0,2M Phosphatpuffer auf 2,5% verdünnt. Der Phosphatpuffer wurde mit Natriumdihydrogenphosphat (Electron Microscopy Sciences, USA) und destilliertem Wasser frisch angesetzt.

Die Proben wurden in dieser Glutaraldehyd-Lösung für eine Stunde primärfixiert. Das Primärfixativ wurde anschließend mit auf 0,1 M verdünnten Phosphatpuffer in 4 Waschgängen á 10 Minuten ausgewaschen. Die primärfixierten Präparate wurden in 0,1M Phosphatpuffer für eine Nacht eingelagert. Das Fixativ für *S. divaricata* wurde zusätzlich mit Natriumchlorid auf 1000 mOsm eingestellt, um den Puffer an die Osmolarität des Gewebes anzupassen.

Sekundärfixierung

Für die Sekundärfixierung wurde 4% Osmiumtetroxid-Lösung (Electron Microscopy Sciences, USA) in 0,1M Phosphatpuffer auf 1% verdünnt. Die Sekundärfixierung der Proben erfolgte umgehend nach der Primärfixierung durch Austausch des Primerfixatives mit der Osmiumtetroxid-Lösung. Die Proben inkubierten in der Osmiumtetroxid-Lösung für 30 Minuten. Das Osmiumtetroxid wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit destilliertem Wasser aus der Probe entfernt.

Entwässerung

Die Proben wurden über eine aufsteigende Alkoholreihe (2x30%, 50%, 70% je 10 Minuten) in 70% Alkohol überführt. Nach einer Nacht Inkubationszeit wurden die Proben in einer weiteren aufsteigenden Alkoholreihe (80%, 90%, 2x100% je 10 Minuten) in 100% Alkohol überführt.

Einbettung in Araldit

Die Einbettung in festes Medium für die transmissionselektronenmikroskopische (TEM)

Analyse wurde mit Epoxidharz Araldit CY 212 durchgeführt. Die Proben wurden in einer aufsteigenden Araldit CY 212 :Propylenoxid (1:3, 1:1, 3:1 je 1h) und anschließend über Nacht in reinem Araldit CY 212 inkubiert, um zu gewährleisten, dass die gesamte Probe von Araldit CY 212 durchzogen ist. Anschließend wurde eine härtende Araldit M Lösung bestehend aus Araldit CY 212, Härter HY964 und BDMA als Polymerisationsstarter im Verhältnis 1:1:0,6 angesetzt. Mit dieser Lösung wurden kleine Böden in die entsprechenden Formen vorgegossen, um ein Absinken der Probe auf den Boden der Form zu verhindern. Die Proben wurden auf diesen Böden ausgerichtet und mit der härtenden Araldit M Lösung überschichtet und bei Bedarf erneut ausgerichtet. Das Aushärten fand bei 60°C über 48 h statt.

Die für das Rasterelektronenmikroskop (REM) vorgesehenen Proben wurden in einem Kritischer-Punkt-Trockner CPD 030 mittels Kritischer-Punkt-Trocknung durch Kohlenstoffdioxid von Feuchtigkeitsresten befreit. Die getrockneten Proben wurden mittels Klebestreifen auf Aluminiumstubs fixiert und anschließend in einem Sputter Coater mit Gold bedeckt. Zur Betrachtung der Proben wurde ein LEO 1430, betrieben mit 15 kV, und der dazugehörigen Software verwendet.

Semidünnschnitte wurden mit einem Glasmesser in einem Leica Ultracut S angefertigt, auf einem Objektträger bei 60°C hitzefixiert und mit Toluidinblau (Toluidinblau: Borax: dest. Wasser 1:2:100) angefärbt. Die so angefärbten Schnitte wurden mittels Lichtmikroskop untersucht, um eine geeignete Stelle für die Ultradünnschnitte zu wählen.

Die Ultradünnschnitte wurde mit einem Diamantmesser angefertigt und auf 1 mm Grids beschichtet mit Formvar aufgetragen und mit 4 %igen Uranylacetat (Electron Microscopy Sciences, USA) für 10 Minuten sowie anschließend in Bleicitrat (Electron Microscopy Sciences, USA) für 5 Minuten kontrastiert. Die Bilder der kontrastierten Proben wurden mit einem Zeiss EM900 bei 50kV mit der zum Gerät gehörenden Software aufgenommen.

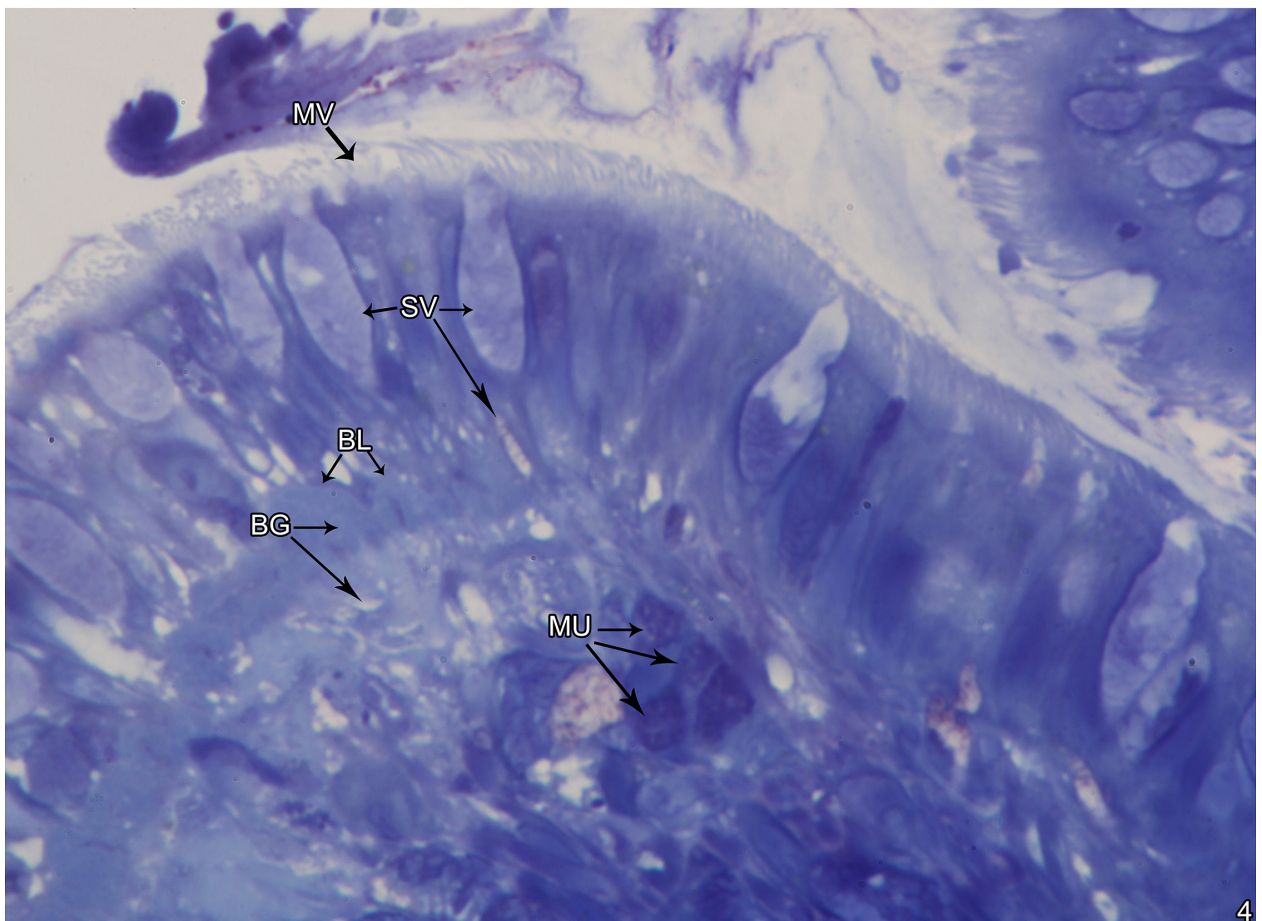
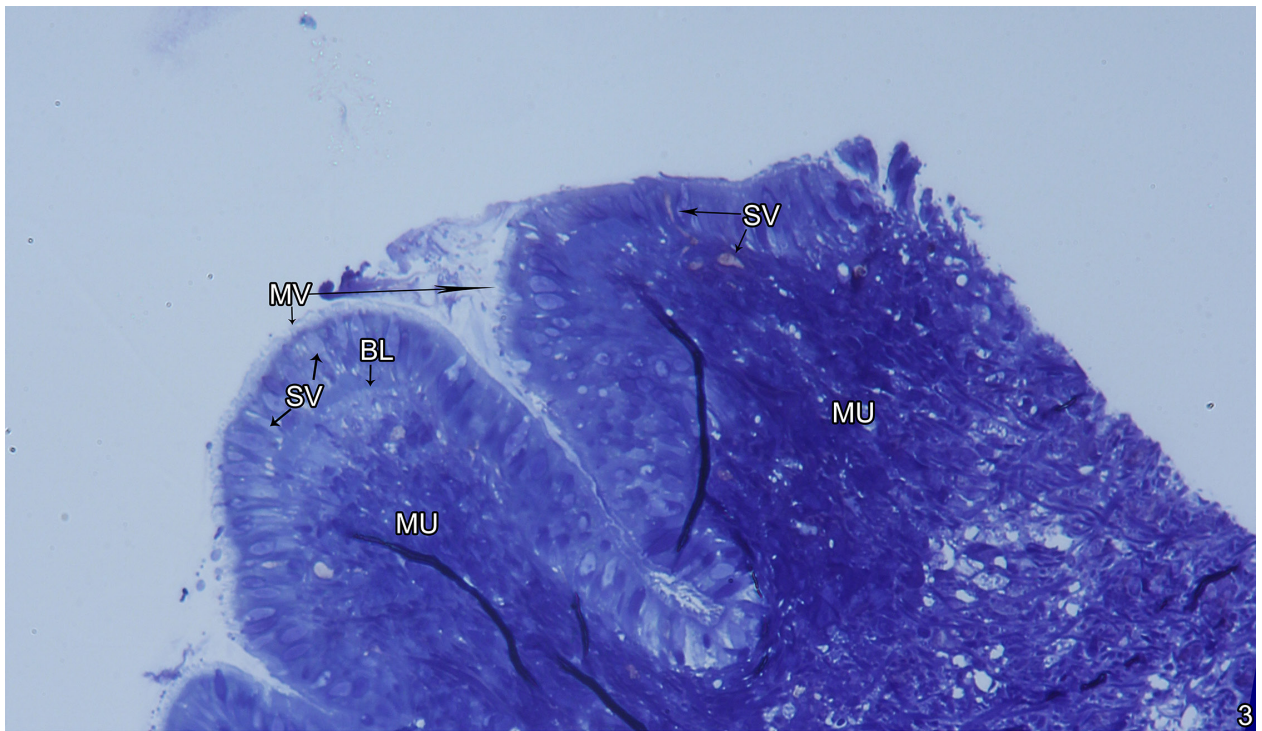


Abb. 3 & 4. Semidünnschnitt vom Fuß von *S. divaricata* eingefärbt mit 1% Toluidinblau bei einer Vergrößerung von 1:40 (3) und 1:100 (4). Die Palisadenstruktur des Epithelgewebes, das zwischen den Zilien (CI) und der Basallamina (BL) liegt, ist erkennbar. Flächige Strukturen mit sekretorischen Vesikeln (SV) sind zu erkennen. Unterhalb der Basallamina liegt die in Bindegewebe (BG) eingebettete Muskulatur (MU).

Ergebnisse

Lichtmikroskopische Betrachtung der Semidünnschnitte

Das Epithel von *P. elegans* besteht aus einer einzelnen Schicht hoher, palisadenförmiger Zellen und besitzt eine pinselartige Oberflächenstruktur bestehend aus kurzen, sehr dicht gepackten Mikrovilli, die nicht durch sensorische oder motorische Cilien durchbrochen werden (Abb. 1). Die Mikrovilli haben ihren Ursprung in Zellen, die zur Hälfte mit Schleimvesikeln ausgefüllt sind. Diese Vesikel sind lose angeordnet, haben eine relativ einheitliche, rundliche Form und eine starke orthochromatische, d.h. blaue Färbung. Unterhalb dieser Mucus produzierenden Zellen liegt abgegrenzt durch die Basallamina die schräge Muskulatur, welche ebenfalls stark blau eingefärbt ist, eingebettet in Extrazelluläre Matrix (Abb. 1).

V. viviparus zeigt ein Epithel, das aus zum Großteil palisadenförmigen Zellen besteht, die zum Teil aber auch eine bauchige Struktur, ausgefüllt mit einem hellen Raum, annehmen können. Dabei zeigt sich das Gewebe unterhalb der Epithelzellen als auffallend heterogen eingefärbt (Abb. 2). Hier liegen die orthochromatisch gefärbten, schräg verlaufenden Muskelzellen mit vereinzelt „dense bodies“ im Bindegewebe eingebettet. Dieses ist durch hell erscheinende sowie granuläre Strukturen charakterisiert. Dem Epithel ist ein Ziliensaum aufgelagert. Die Schleimvesikel füllen hingegen einen wesentlich größeren Teil der Epithelzellen aus (ca. 70-80 %). Dabei lassen sich zwei unterschiedliche Typen beschreiben; der Erste zeigt sich stark blau eingefärbt, rundlich und klein, während der Zweite bedeutend größer und fast weiß erscheint (Abb. 2).

S. divaricata (Bild 3) besitzt einen ausgeprägten, dicht gepackten Mikrovillisaum der eine palisadenförmige Zellschicht bedeckt, hinter der sich das Bindegewebe mit eingebetteter Muskulatur anschließt (Abb. 3 u. 4). Dieser ist in sehr stark gefärbten Bereichen nur als Pinselstruktur erkennbar. Die Epithelzellen sind mit großen Schleimvesikeln ausgefüllt und das Austreten von Mucus aus dem Epithel kann an mehreren Stellen beobachtet werden. Die sich dem Epithel anschließende schräge Muskulatur ist stark orthochromatisch gefärbt. Es zeigen sich hier aber auch metachromatisch, d.h. violett, eingefärbte Bereiche (Abb. 4).

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM-Aufnahmen)

P. elegans zeigt ebenfalls eine palisadenförmige Epithelzellstruktur mit Mikrovillisaum. Das palisadenförmige Gewebe hat eine Länge von ca. 17 μm gemessen von der Spitze der Mikrovilli. Die Mikrovilli sind ca. 1,6 μm lang und ca. 0,1 μm dick. Der Mikrovillisaum ist ca. 10 Mikrovilli/ μm Dicht. Die Breite der einzelnen Zellen ist aufgrund wiederholt auftretender Freiräume nicht messbar. Die Mikrovilli sind von einer Netzstruktur überlagert. In einem Abstand von ca. 12 μm zur Spitze des Mikrovillisaums ist ein Zellkern erkennbar, der eine Länge von ca. 4,7 μm und eine Breite von ca. 1,5 μm hat. (Abb. 5)

V. viviparus zeigt die palisadenförmige Struktur der Epithelzellen, wobei diese ausgefranst erscheint. Unterhalb der Palisadenstruktur liegt das Bindegewebe als filamentöse Struktur. Auf der Oberfläche der Epithelzellen ist ein dichter Ziliensaum, auf dem in unregelmäßigen Abständen Netzstrukturen existieren. Die Länge der Epithelzellen, gemessen vom Ansatz des Ziliensaums bis zum Bindegewebe, beträgt ca. 15 μm . Die Zilien sind ca. 8 μm lang und ca. 0,2 μm dick. (Abb. 6)

Die Palisadenstruktur des Epithelgewebes von *S. divaricata* ist gut erhalten und der Übergang zum Bindegewebe klar erkennbar. Im unteren, rechten Bildviertel ist das Bindegewebe von den Epithelzellen gelöst. Die Mikrovilli haben eine Länge von ca. 3,5 μm bei einer Dicke von ca. 0,1 μm und erscheinen teilweise gekrümmt. Der Mikrovillisaum besitzt eine Dichte von 5 Mikrovilli/ μm . Auf der Oberfläche der Mikrovilli sind intakte Vesikel sowie netzartige Strukturen zu erkennen. Die Epithelzellen messen von der Spitze des Mikrovillisaums bis zum Ansatz des Bindegewebes ca. 14 μm bei einer Breite von ca. 2 μm . In einem Abstand von ca. 9 μm zur Spitze des Mikrovillisaums ist ein Zellkern mit einer Länge von ca. 3,8 μm und einer Breite von ca. 1,8 μm zu erkennen. (Abb. 7)

Ausgetretene Vesikel die auf der Epidermis lokalisiert sind, konnten bei *S. divaricata* nachgewiesen werden (Abb. 8 u. 9). Diese haben eine relativ einheitliche, rundliche Form und viele sind an einigen Stellen eingedellt. Sie sind zahlreich, jedoch nicht gleichmäßig über das

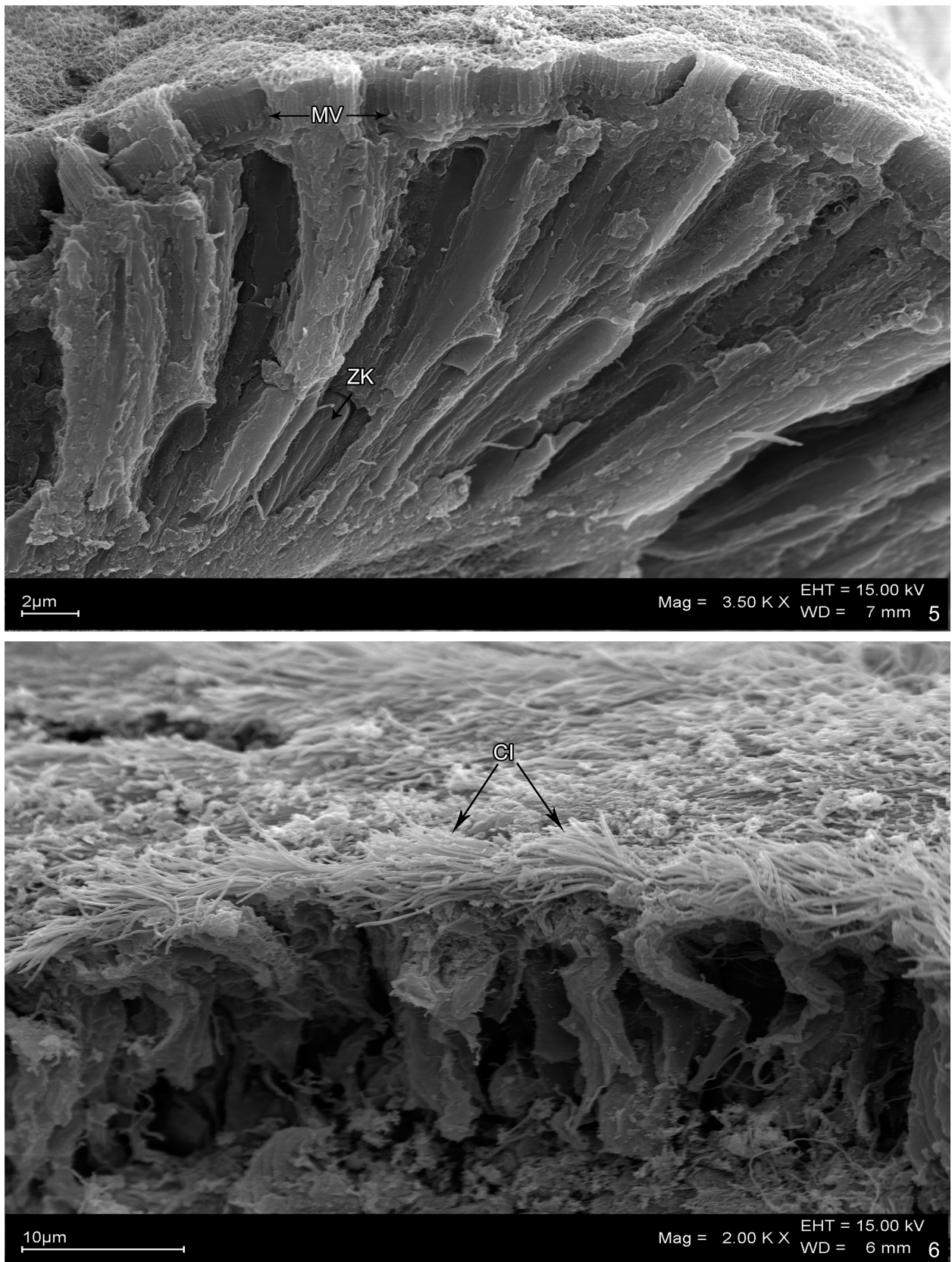


Abb. 5 & 6. REM-Aufnahme von *P. elegans* bei 3.500-facher (5) und vom Fuß von *V. viviparus* bei 2.000-facher (6) Vergrößerung. Die Mikrovilli (MV) von *P. elegans* sind als stäbchenförmige Gebilde unterhalb einer Netzstruktur erkennbar. Das Innere der Epithelzellen fehlt zum Großteil, ein Zellkern (ZK) ist erkennbar (5). Die Zilien (CI) liegen dem Epithel von *V. viviparus* wie Haare auf. Die Struktur der Epithelzellen ist nicht erhalten geblieben (6).

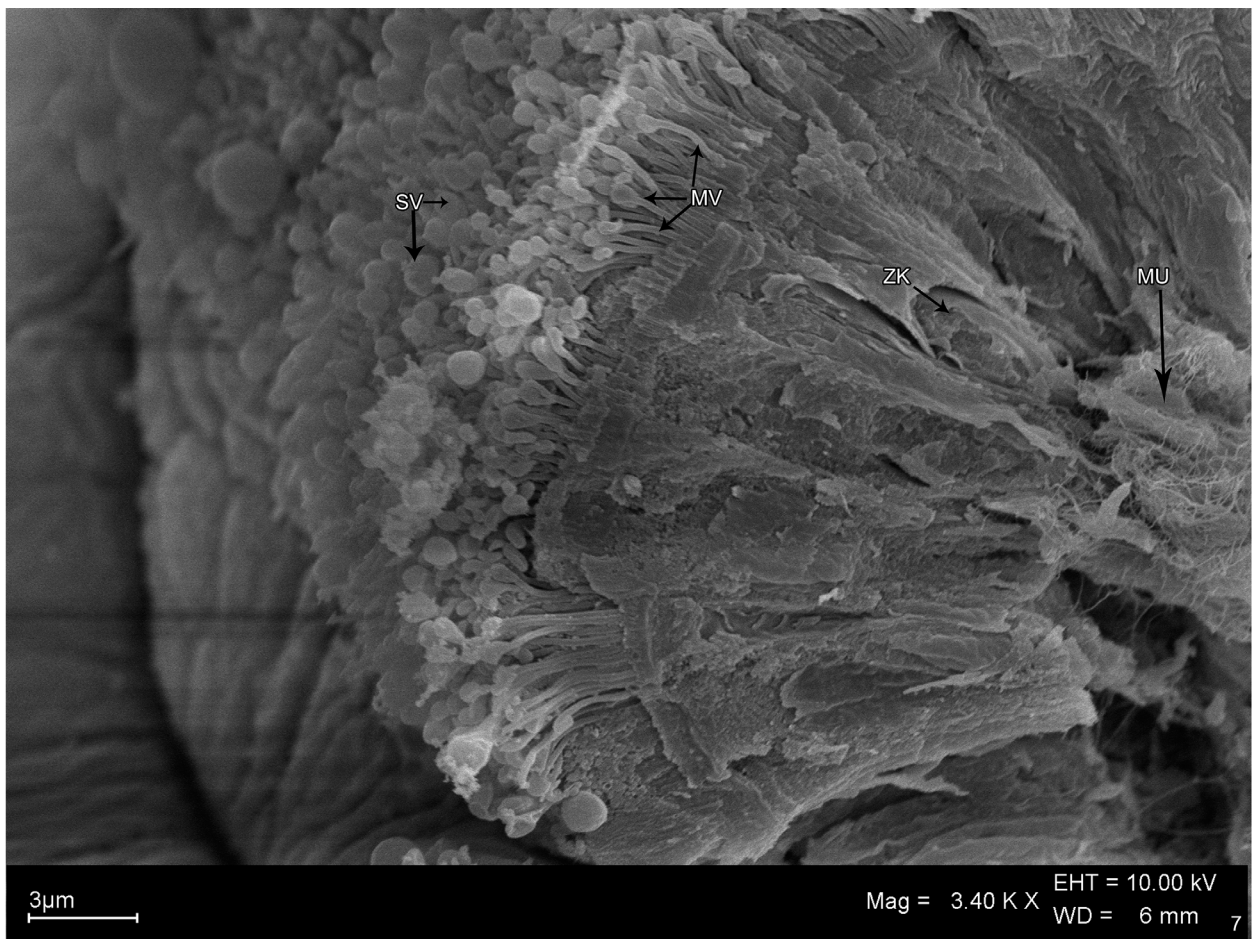


Abb. 7. REM-Aufnahme vom Fuß von *S. divaricata* bei 3.400-facher Vergrößerung. Der Mikrovillisaum (MV) ist gut erkennbar und scheint von sekretorischen Vesikeln (SV) bedeckt zu sein. Die Struktur der Epithelzellen sowie ein Zellkern (ZK) sind gut erhalten. Subepithelial befindet sich Muskelgewebe (MU).

Epithel verteilt. Ihre Größe variiert beträchtlich von 0,2 – 4,0 μm .

Selbst nach Austritt aus den Epidermiszellen sind sie noch weitestgehend intakt, an einigen Stellen ist des Weiteren eine netzartige Struktur zu beobachten (Abb. 8).

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen (TEM-Aufnahmen)

Bei der detaillierten Betrachtung des Epithelgewebes von *P. elegans* (Abb. 10) zeigt sich, dass die Mikrovilli eine Länge von 1,5 μm und eine Breite von 0,1 μm haben. Die Dichte des Mikrovillisaums liegt bei ca. 6,5 Mikrovilli/ μm . In einem Abstand von ca. 2,8 μm zur Spitze der Mikrovilli befindet sich ein Gürteldesmosom, welches die beiden benachbarten Zellen miteinander verbindet. Die Vesikel variieren in ihrem Erscheinungsbild: kleine Vesikel sind annähernd rund mit einem Radius von ca. 0,8 μm während größere Vesikel eher oval sind bei einer Länge von ca. 2 μm und einer Breite von ca. 1,4 μm . Der Zellkern beginnt ca. 17,5 μm entfernt vom

Mikrovillisaum und hat eine Länge von 4,8 μm und eine Breite von 2,1 μm . Das untere Ende des Zellkerns ist ca. 3,8 μm von der Basallamina entfernt. Die Zelle ist insgesamt ca. 26 μm lang. *V. viviparus* zeigt bei starker Vergrößerung (Abb. 11) keine deutlich erkennbaren Zell-Zell-Grenzen wodurch die Struktur der Epithelzellen nicht bewertet werden kann. Oberhalb der Basallamina befinden sich vakuoläre Lumen, die den unteren Teil der Zellen bis zu einem Abstand von ca. 14 μm zur Basallamina komplett ausfüllen. Die Zellkerne sind unregelmäßig geformt mit länglichen Auswüchsen. Sie liegen mittig in der Zelle und ihr Inneres besteht aus einer heterogenen Masse aus abwechselnd elektronendurchlässigerem und -dichterem Material. Oberhalb des Zellkerns befinden sich sekretorische Vesikel. An der Oberfläche des Epithelgewebes treten Zilien hervor in einer Dichte von ca. 7 Zilien/ μm . Die Epithelzellen haben eine Länge von ca. 36 μm , die Breite lässt sich aufgrund der fehlenden Zell-Zell-Grenzen nicht bestimmen. Die vom Binde-

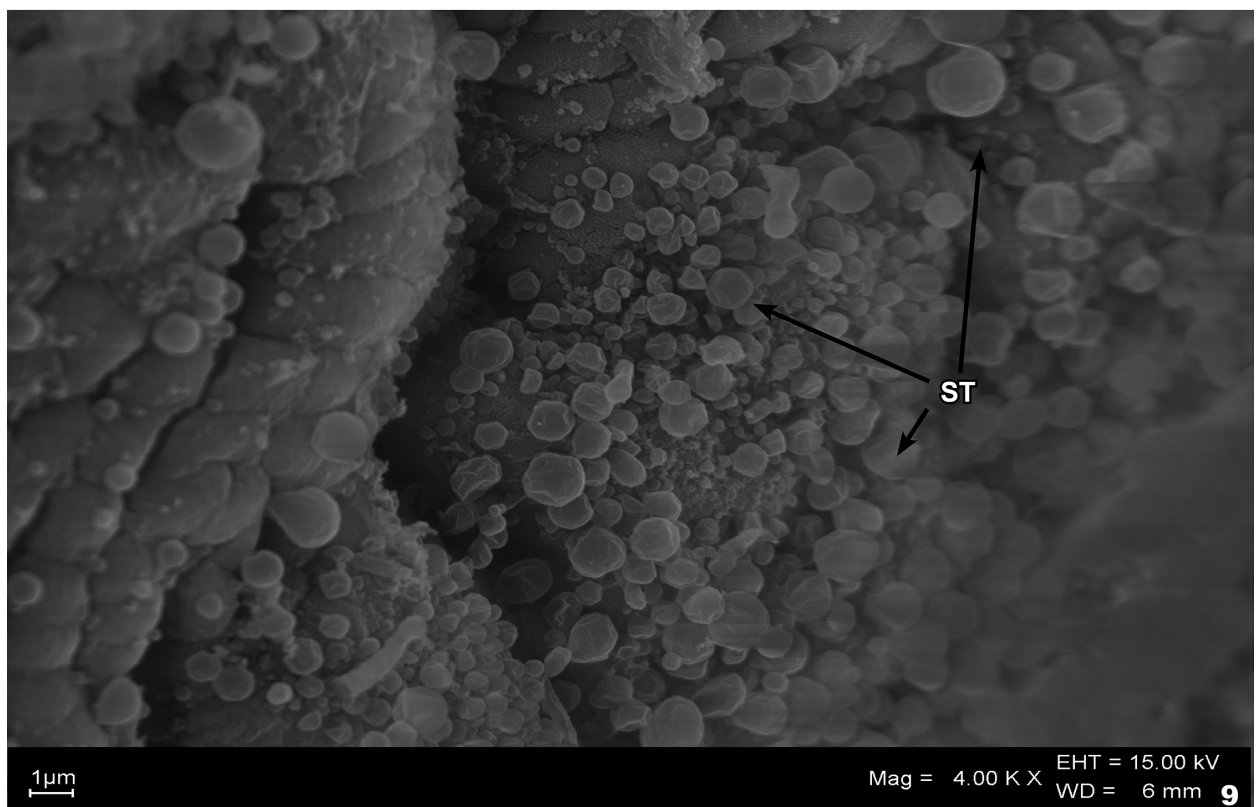
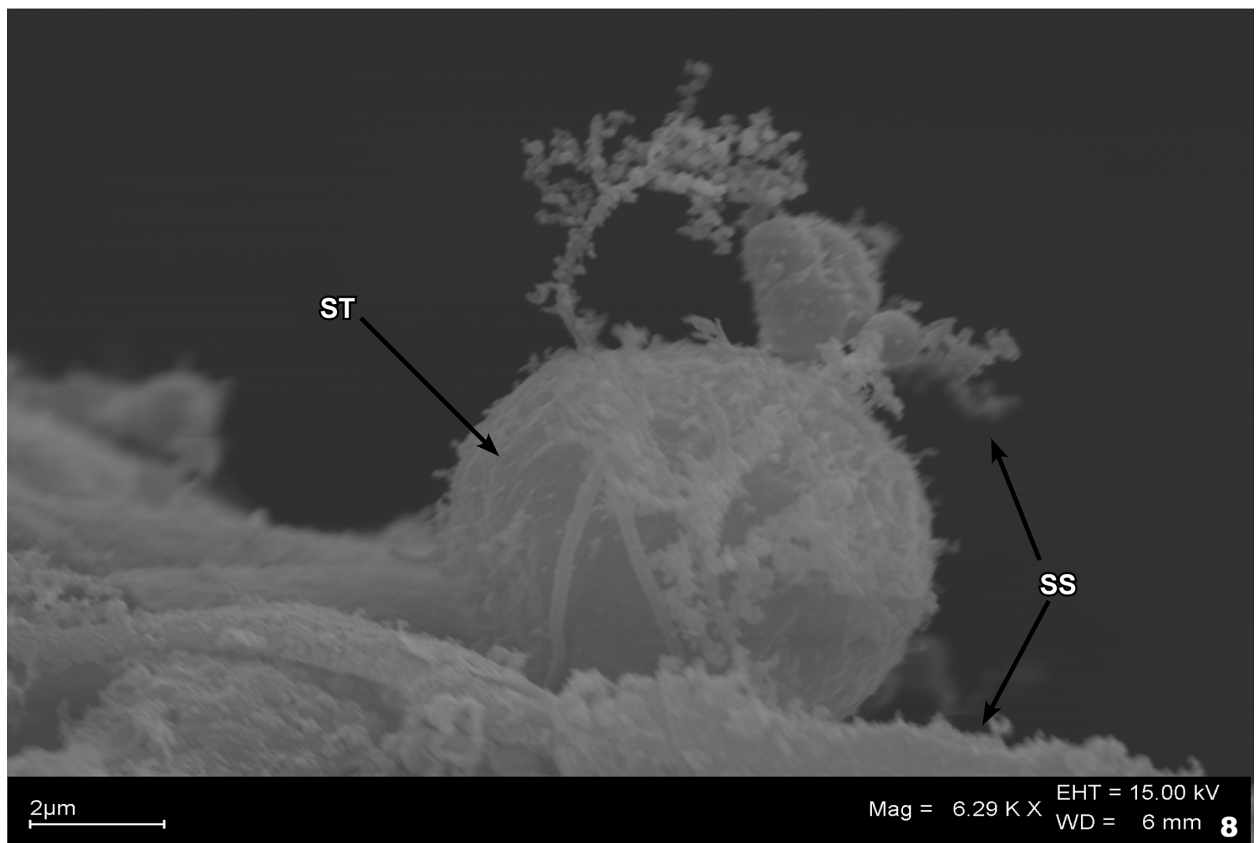


Abb. 8 & 9. REM-Aufnahme der Epidermis des Fußes von *S. divaricata* mit auf dem Epithel aufliegenden Schleimtröpfchen (ST) und einer Schleimschicht (SS) (8). Die Tröpfchen liegen noch in ihrer rundlichen, meist etwas eingedellten, Form erhalten auf der Epidermis auf.

Tabelle 1. Auflistung der Eigenschaften der Vesikel der beschriebenen Drüsenzelltypen bei *V. viviparus*, *S. divaricata* und *P. elegans*. Die Bezeichnung folgt hierbei dem Gattungsnamen sowie einer nachfolgenden Nummerierung. Unterschieden wurde in Gestalt, Dichte, Fülle und Elektronendichte der Vesikel.

Drüsentyp	S1	S2	S3	S4	S5	P1	V1
Vesikelgestalt	polygonal	ellipsoid	nicht erkennbar	rundlich	eingefaltet / rundlich	eingefaltet / rundlich	polygonal / rundlich
Vesikeldichte	dicht	weniger dicht	Zelle ausfüllend	weniger dicht	weniger dicht	weniger dicht	weniger dicht
Vesikelfüllung	homogen	homogen	granulär	homogen	granulär / homogen	granulär / homogen	granulär / homogen
Elektronen- dichte der Vesikel	+ / ++	++	+ / ++	-	- / +	- / +	+ / ++

gewebe umschlossenen Muskelfasern besitzen nahezu runde Zellkerne von einem Durchmesser von ca. 1,45 μm .

Starke Vergrößerungen von *S. divaricata* (Abb. 12) zeigen sehr homogene Zellstrukturen mit schlecht erkennbaren Zell-Zell-Grenzen. Oberhalb der Basallamina befinden sich zum Teil stark ausgeprägte vakuoläre Lumen, deren exakte Positionierung unterhalb des Zellkerns ebenso wie ihre Größe variiert. Das Innere der Zellkerne besteht aus einer heterogenen Masse aus abwechselnd elektronendurchlässigerem und -dichterem Material. Hierbei überwiegt die Menge an elektronendurchlässigerem Material. Oberhalb der Zellkerne befinden sich erneut vesikuläre Strukturen bestehend aus elektronendichtem und elektronendurchlässigem Material. Oberhalb der Epithelzellen sind Zilien zu erkennen die eine Dichte von ca. 7 Zilien/ μm besitzen. Aufgrund der großen Varianz bei Kern- und Zellmorphologie in der Aufnahme wurde auf ein Vermessen dieser Komponenten verzichtet. Das Epithelgewebe besitzt eine Länge von ca. 45 μm von Basallamina zu Peripherie.

Eine zweite Gewebeprobe von *S. divaricata* (Abb. 13) besitzt einen ausgeprägten Mikrovillisaum auf der Oberfläche des Epithelgewebes. Unterhalb der Mikrovilli sind keine sekretorischen Vesikel zu erkennen. Die Zellkerne liegen basal oberhalb der Basallamina und haben ein heterogenes Inneres. Die Mikrovilli sind ca. 1,8 μm lang und ca. 0,1 μm breit. Die Mikrovillidichte liegt bei ca. 5 Mikrovilli/ μm

Eine Nahaufnahme der Zell-Zell-Grenze von *V. viviparus* zeigt, dass die Zellmembran von Membran Innen- bis Außenseite 0,1 μm dick ist (Abb. 14). Der Extrazelluläre Raum ist an der

dicksten Stelle 177 μm breit. Die Membran der benachbarten Zelle ist ebenfalls 0,1 μm dick.

Bei den verglichenen Arten kann man unterschiedliche Drüsenzelltypen vor Allem auf Grund der Gestalt, Dichte, Fülle und Elektronendichte ihrer Vesikel charakterisieren. Dabei haben wir die Bezeichnung der jeweiligen Drüsentypen so gewählt, dass auf den Anfangsbuchstaben des Gattungsnamen die Nummerierung folgt. In Tab.1 sind die genutzten Unterscheidungsmerkmale zu den charakterisierten Drüsenzellen aufgelistet.

Es konnten bei dieser vergleichenden Studie 5 Typen von Drüsenzellen an Hand der gewählten Charakteristika Gestalt, Dichte, Füllung und Elektronendichte ihrer Vesikel unterschieden werden: S1 ist dicht gepackt mit fast polygonal geformten Sekretvesikeln, welche heterogen, jedoch tendenziell elektronendurchlässig sind (Abb. 15). S2 ist lockerer gepackt mit ellipsoid geformten Vesikeln, die mit deutlich elektronendichterem Material gefüllt sind (Abb. 15). S3 ist großflächig granulär gefüllt mit einzelnen elektronendichten Teilen (Abb. 15), während S4 fast transluzente, vakuolenartige Sekretvesikel besitzt (Abb. 16). Die als S5 (Abb. 22) betitelten Drüsen scheinen mit zwei Arten von Vesikeln gefüllt zu sein. Die erste ist mit fast komplett elektronendurchlässigem Material gefüllt, ähnlich wie bei S4. Nur ganz schwach ist bei einigen Vesikeln eine granuläre Struktur zu erahnen. Die andere ähnelt einem Mitochondrium, ist aber sehr unregelmäßig eingefaltet und heterogen elektronendicht (siehe auch Abb. 21).

Für *V. viviparus* und *P. elegans* haben wir nur einen Typus differenzieren können: V1, welcher die gleichen Attribute wie S5 vorweist (Abb. 22)

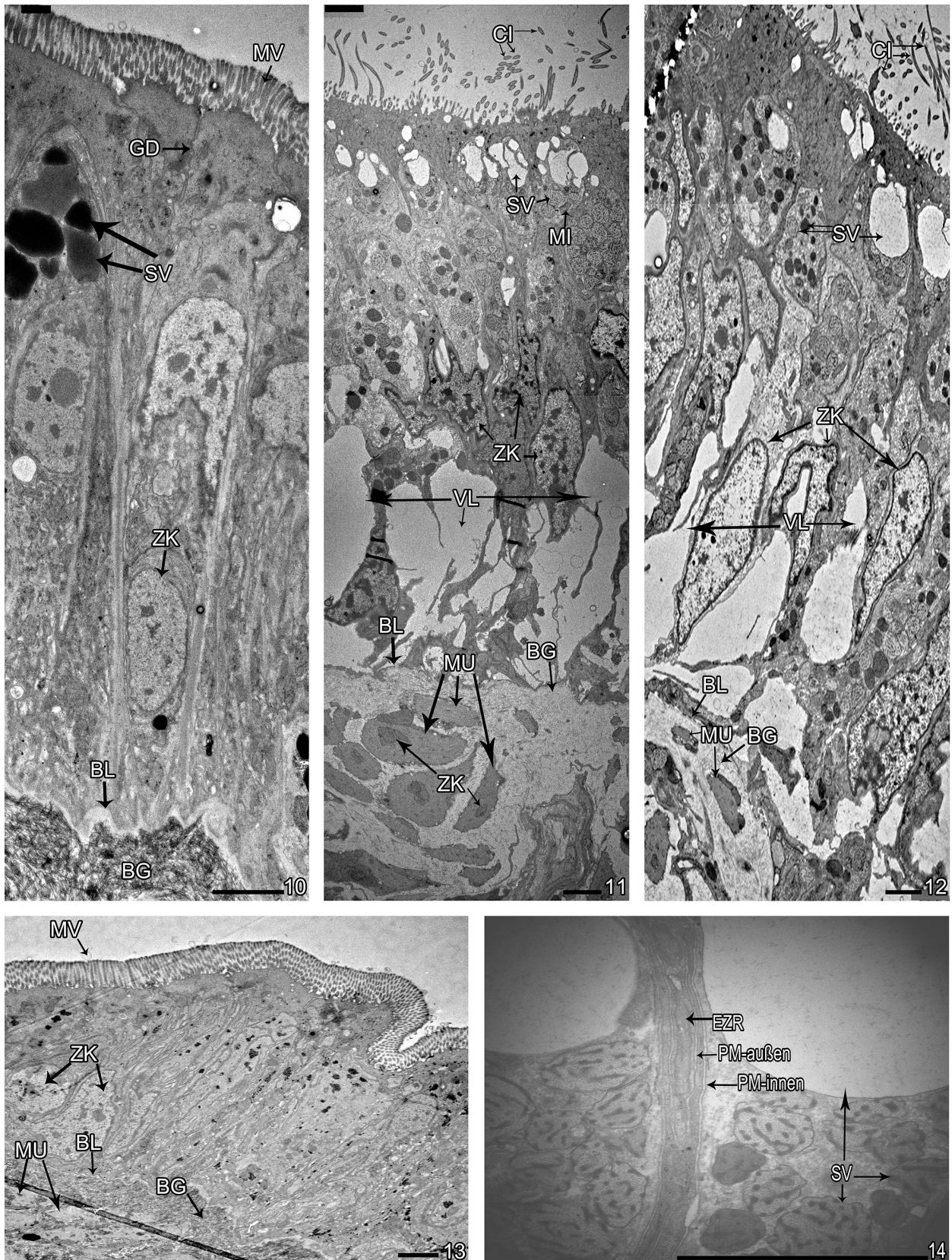


Abb. 10 - 14. Vergleich der Epithelzellstrukturen von *P. elegans* (10) *V. viviparus* (11 u. 14) und *S. divaricata* (12 u. 13) mittels TEM-Aufnahmen. Die dem Epithel aufliegenden Mikrovilli von *P. elegans* (Abb. 10) und *S. divaricata* (13) sowie Zilien von *V. viviparus* (11) und *S. divaricata* (Abb. 12) sind deutlich zu erkennen. Sekretorische Vesikel (SV) zeigen sich in unterschiedlicher Form und Elektronendichte (10-14). Die basal-liegenden Zellkerne (ZK) sind entweder uniforme, längliche Strukturen (10) oder besitzen Ausstülpungen (11 u.12). Unterhalb der Zellkerne können vakuoläre Lumen (VL) beobachtet werden (11 u.12). Die Basallamina ist als elektronendurchlässiger „Faden“ zu erkennen (10-13). Das sich anschließende Bindegewebe (BG) ist stark granular (10), oder homogen und elektronendurchlässig (11 u. 12). Die Muskulatur (MU) setzt sich deutlich vom Bindegewebe ab (11-13) und zeigt Kernstrukturen (12). Gürteldesmosome (GD) sind nahe der Spitze von *P. elegans* erkennbar (10). Die innere (PM-innen) sowie äußere Schicht (PM-außen) der Plasmamembran (Fortsetzung nächste Seite)

und P1, gefüllt mit sehr heterogenen, elektronendichten und -durchlässigen Vesikeln, welche eine polygonale Gestalt haben (Abb. 17 u. 18).

Subepithelial lokalisierte Drüsenzellen vom Typus S1 konnten ebenfalls bei *S. divaricata* identifiziert werden. Diese sind eng von den Zisternen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und vom Golgi-Apparat umgeben (Abb. 19). Auf Abbildung 20 lassen sich die Axoneme mit ihrer klassischen 9x2+2 Anordnung über die elektronendichteren Flecken am Rand und in der Mitte des Querschnittes erkennen.

Diskussion

Wir haben die Gastropoden-Arten *V. Viviparus*, *P. elegans* und *S. divaricata* als Vertreter der verschiedenen Habitate Süßwasser, Meer und Land ausgewählt und ihre Epidermis mit Licht- sowie Elektronenmikroskopischen Techniken betrachtet. Dabei sind wir im Besonderen auf Zellfortsätzen sowie Drüsenzellen eingegangen und haben diese im vorangegangenen Abschnitt auf zellulärer Ebene beschrieben. Nun wollen wir darauf aufbauend eventuelle Unterschiede zwischen den Arten vergleichend besprechen.

Es wurde erwartet, dass aquatisch lebende Gastropoden einen dichteren Mikrovillisaum besitzen um den geringeren Sauerstoffgehalt ihres Lebensraumes (260 mg/L in Luft zu 7,38-7,60 mg/L in Salzwasser) auszugleichen. Entgegen dieser Erwartungen besitzt *S. divaricata* nach Auswertung der REM-Bilder nur etwa 5 Mikrovilli/ μm während *P. elegans* etwa 10 Mikrovilli/ μm besitzt. Die TEM-Bilder zeigen eine geringere Differenz von 5 Mikrovilli/ μm bei *S. divaricata* zu 6,5 Mikrovilli/ μm bei *P. elegans*. Diese bestätigen damit aber dennoch, dass *S. divaricata* einen weniger dichten Mikrovillisaum besitzt als *P. elegans*. Bei genauerer Betrachtung der Literatur zeigt sich das laut Finch (1975) *Viviparus contectoides* ungefähr 0,13 $\mu\text{g O}_2/\text{h}$ verbraucht. Das bedeutet, dass ungefähr 54-mal so viel Sauerstoff im Meerwasser gelöst ist wie *Viviparus contectoides* benötigt. Auch wenn es

Ebenso wie die Drüsentypen V1 und S5, ist auch der Rest der Epidermisstruktur bei *S. divaricata* und *V. viviparus* an der ventralen Seite des Fußes sehr ähnlich strukturiert (Abb. 22 u. 23). Beide besitzen nur spärlich vorhandene Mikrovilli, dafür aber eine zahlreiche Präsenz von motorischen Zilien. Die elektronendurchlässigeren Vesikel, die vakuolenartig erscheinen, sind jeweils am apikalen Ende der Drüsen angesiedelt, während die eingefalteten, elektronendichteren basal davon lokalisiert sind (Bild 22. u. 23).

sich bei der von Fitch untersuchten Art um eine Süßwasserschnecke handelt, kann man davon ausgehen, dass der Sauerstoffverbrauch von marinen Gastropoden eine ähnliche Größenordnung hat. Umgebungssauerstoff ist demnach für Gastropoden in gut belüfteten Gewässern kein limitierender Faktor.

Das Verringern der Oberfläche durch eine geringere Anzahl an Mikrovilli könnte demnach eine Anpassung an den osmotischen Umgebungsdruck darstellen, um damit das Risiko des Austrocknens durch Wasserverlust an die Umgebung zu verringern.

Es wird deutlich, dass *V. viviparus* im Gegensatz zu den beiden anderen Arten, im betrachteten Bereich keinen Microvillisaum, aber stattdessen zahlreiche Zilien besitzt. Nach Portela (2012) ist das ein Anzeichen für die Fußsohle. Hier wird Adhäsions- und Gleitschleim ausgeschieden und die Zilien verteilen diesen auf die gesamte Sohle und unterstützen die Lokomotion. Mikrovilli zum Stoffaustausch bzw. zur Atmung werden hierbei nicht benötigt.

Interessant ist auch die sehr große Ähnlichkeit der Epithelstruktur von *V. viviparus* inklusive Drüsen, Sekretvesikeln und Zilienabundanz zu jener in Bereichen des Epithels von *S. divaricata*. Beide Schneckenarten leben im mäßig fließenden/umspülten Bereich ihrer Gewässer

(Fortsetzung Bildunterschrift vorangegangene Seite)

und der Extrazelluläre Raum (EZR) lassen sich gut vom Rest des Gewebes abgrenzen (14). Die Maßstabsbalken entsprechen stets 2.5 μm .

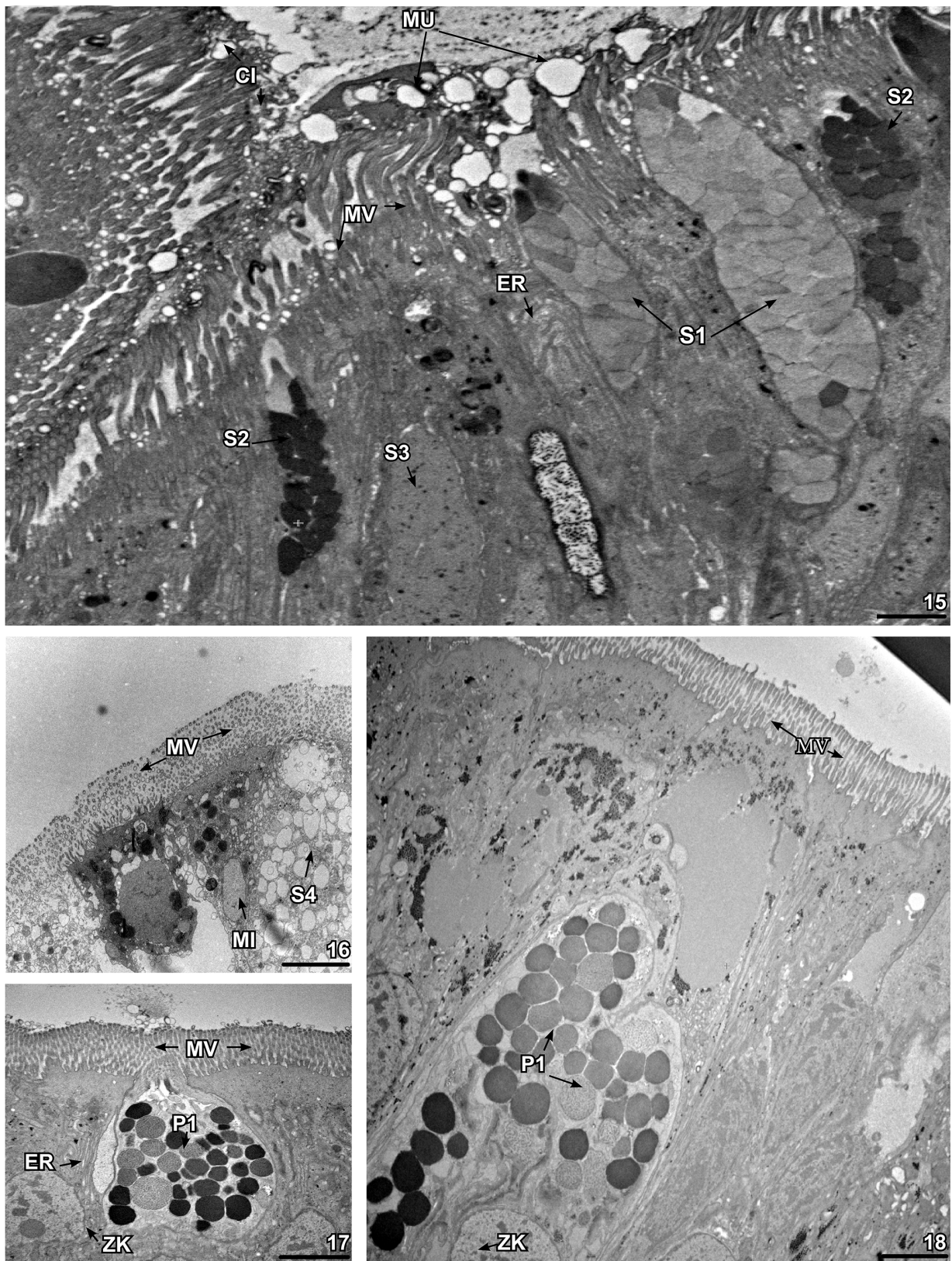


Abb. 15 - 18. Vergleich der Drüsenzellen der untersuchten Arten *S. divaricata* (15, 16) und *V. viviparus* (17, 18); TEM-Aufnahme. Zu sehen ist der Mikrovilisaum (MV), die überragenden Zilien (15) (CI), die aus der Zelle ausgetretenen Schleimvesikel (MU) und die Schleimschicht (15). Die Zellkerne (ZK) sind durch die birnenförmig geformten Drüsen im basalen Teil der Zellen lokalisiert. Ebenfalls sichtbar sind Mitochondrien (MI) und das am Zellkern anliegende Endoplasmatische Retikulum (ER). Es sind von *S. divaricata* 4 Drüsentylen dargestellt (S1 - 4). S1 ist dicht gepackt mit fast polygonal geformten Sekretvesikeln, welche heterogen, jedoch tendenziell elektronendurchlässig sind (15). S2 ist lockerer gepackt mit ellipsoid geformten Vesikeln, die mit deutlich elektronendichtem Material gefüllt sind (15). S3 ist großflächig granulär gefüllt mit einzelnen elektronendichten Teilen (15), während S4 fast transluzente, vakuolenartige Sekretvesikel besitzt (16). Auf Abb. 17 ist sehr deutlich zu erkennen, wie eine Drüsenzelle ihren Inhalt nach außen gibt (P1). Sie ist gefüllt mit sehr heterogen elektronendichten und -durchlässigen Vesikeln, welche eine polygonale Gestalt haben. Die Maßstabsbalken entsprechen stets 2.5 µm.

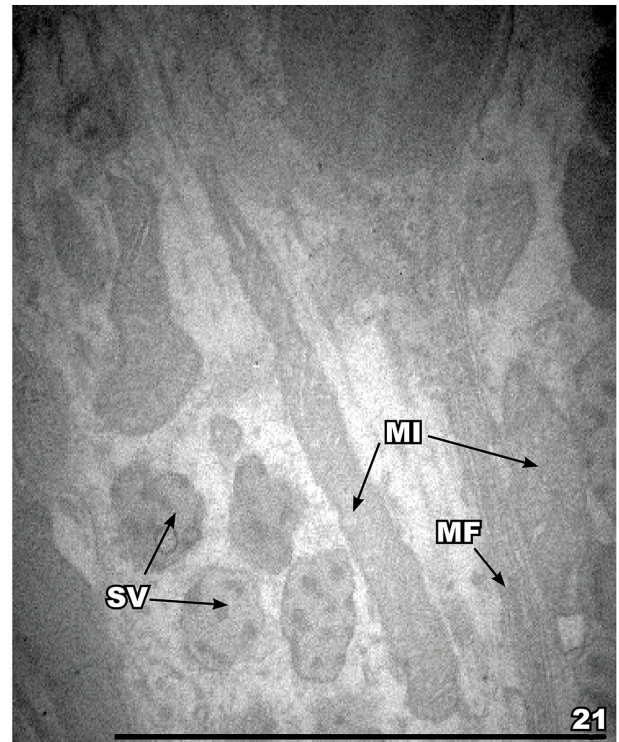
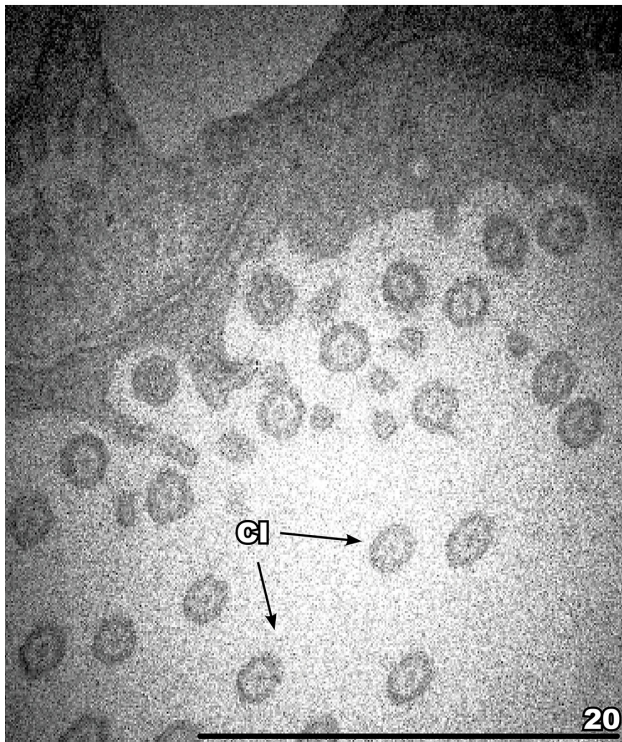
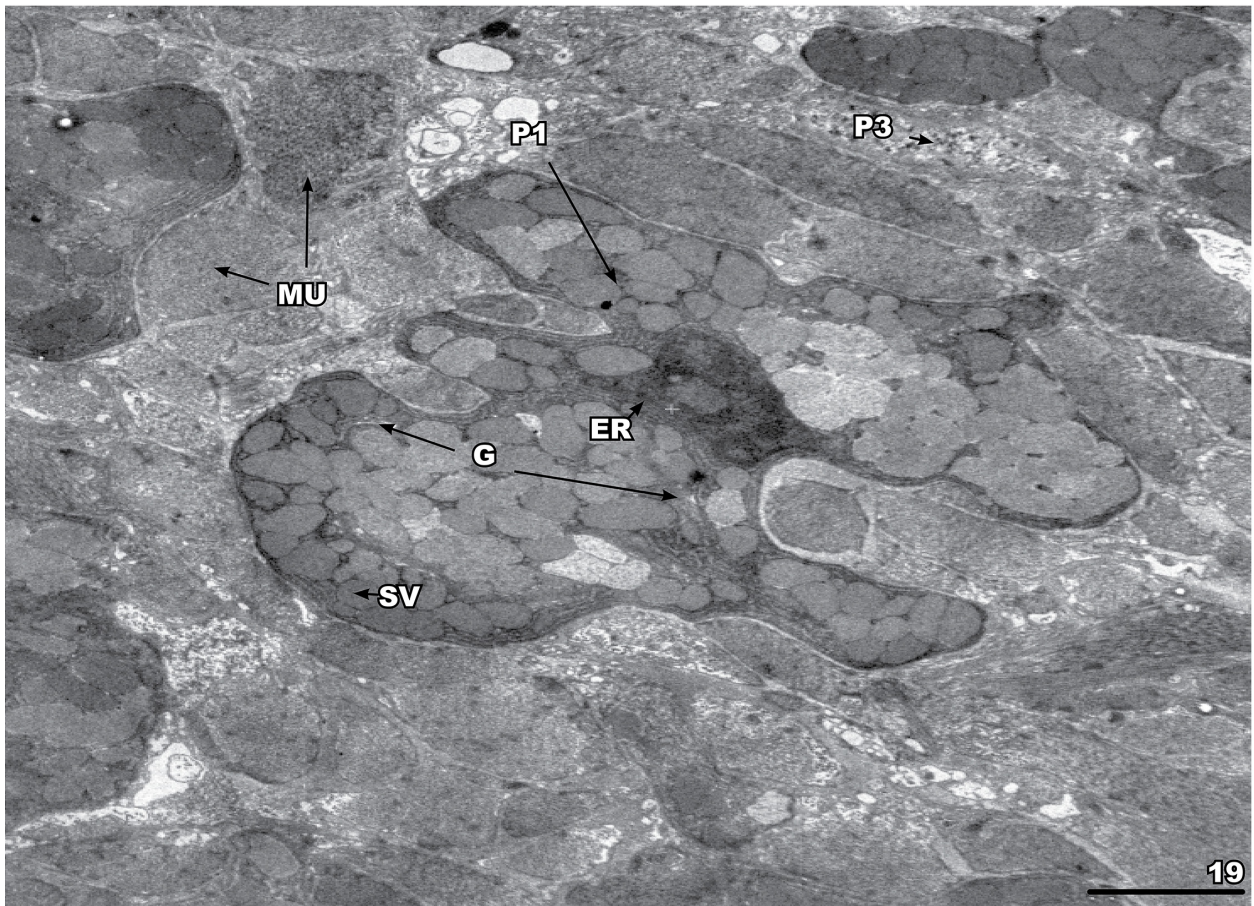


Abb. 19 - 21. TEM-Aufnahmen von subepithelialen Drüsenzellen der Epidermis am Fuß von *S. divaricata* (19) und zwei Detailaufnahmen von *V. Viviparus* (20 u. 21). Auf Abb. 19 Dargestellt ist eine Drüsenzelle (S1) mit äußerst ausgeprägtem Golgi-Apparat (G) und Endoplasmatischem Retikulum (ER) gefüllt mit Sekretvesikeln (SV). Umgeben ist diese von Muskelzellen (MU) und weiteren Drüsenzellen (S1 u. S3). (20) Detailaufnahme von Zilien (CI) im Querschnitt. Deutlich ist die 9x2+2 Mikrotubulstruktur erkennbar. (21) Vergleichsbild der Sekretvesikel (SV) aus dem Drüsentyp V1 mit Mitochondrien (MI). Zwischen den Epithelzellen laufen Muskelfasern (MF). Die Maßstabsbalken entsprechen stets 2.5 µm.

und brauchen daher eine vergleichbare Adhäsionswirkung ihres Schleims. Dies hatten wir schon in unserer Erwartung formuliert, jedoch konnte die bei Greifstorfer (2017) beschriebene größere Vielfaltigkeit der Drüsentypen an der Fußsohle nicht bestätigt werden.

An der ventralen Seite des Fußes wurde nur pro Art jeweils ein Drüsentyp beschrieben, während an der dorsalen Seite von *S. divaricata* die Drüsenzellen S1-4 unterschieden werden konnten. Gesamt gesehen liegt die marine Schnecke *S. divaricata* mit 5 verschiedenen Drüsenzelltypen vor *P. elegans* und *V. viviparus* mit nur jeweils einem. Dies deckt sich mit der Untersuchung von von Byern (2017), nach jener marine Gastropoden im Schnitt mit mehr unterschiedlichen Drüsenzelltypen ausgestattet sind.

Zusätzlich dazu sind die beobachteten Unterschiede auch damit zu erklären, dass der betrachtete Bereich sich bei *V. viviparus* auf die ventrale Seite des Fußes und bei *P. elegans* auf die Tentakel beschränkt hatte, an der weniger Drüsenzellen, dafür mehr Rezeptorzellen vorkommen (Simkiss 1988).

Mittels der REM-Aufnahmen konnte ein Einblick in die Oberflächenstruktur der Epidermis gegeben werden, wobei festgestellt wurde, dass zwischen oder auch über den Zellfortsätzen eine netzartige Struktur ausgebildet ist. Darüber hinaus sind bei *S. divaricata* intakte Schleimtröpfchen sichtbar gewesen, die auch von netzartigen Strukturen umgeben sind. Diese netzartige Struktur haben wir als Schleimschicht interpretiert, da gemäß Deyrup-Olsen, Luchtel und Martin (1983) Vesikel bei Gastropoden intakt ausgeschieden und ihr Inhalt erst über exogene Faktoren freigesetzt wird.

Somit sind die an der Fußsohle ausgeschiedenen Sekretvesikel bei *V. viviparus* und *S. divaricata* vermutlich schon durch Reibung am Boden zerstört worden. Ihr Inhalt wurde daraufhin freigesetzt, ist am Epithel polymerisiert und hat eine netzartige Struktur ausgebildet. Da bei *S. divaricata* die beschriebenen Schleimtröpfchen an der dorsalen Seite des Fußes lagen, sind diese mangels exogener Faktoren größtenteils intakt geblieben.

Fazit

Durch unsere Studien konnten wir feststellen, dass die Mikrovilli-Dichte im Epithel der marinen Schnecke *S. divaricata* geringer als bei der Landschnecke *P. elegans* ausfällt. Damit konnte unsere Erwartung, dass der geringere Sauerstoffgehalt im Meerwasser zu einer Ausbildung eines dichteren Mikrovillisaums führen würde, nicht bestätigt werden. Eventuell wird diese Beobachtung eher durch den gesteigerten osmotischen Druck, dem die marine Schnecke ausgesetzt ist, erklärt.

Darüber hinaus konnte ein fast vollständiges Fehlen von Mikrovilli an der ventralen Seite des Fußes vom Süßwasser-Gastropod *V. viviparus* und der marinen Schnecke *S. divaricata* beschrieben werden. Stattdessen ist dieser Bereich von zahlreichen motorischen Zilien mit der Mikrotubuli-Struktur $9 \times 2 + 2$ besetzt, die die Lokomotion des Tieres unterstützen.

Beim Vergleich dieser zwei Arten ist ebenfalls deutlich geworden, dass die generelle Struktur und im Speziellen die Drüsenzellen V1 und S5 in diesem Bereich sehr ähnlich sind. Das leuchtet ein, wenn man sich die jeweiligen Habitate vor Augen führt. Diese sind bei beiden durch Umspülung von erhöhten Ansprüchen an die Adhäsion am Substrat geprägt.

Wir haben schließlich für *S. divaricata* fünf und für *P. elegans* und *V. viviparus* jeweils einen Drüsenzelltyp mittels ultrastrukturellem Vergleich beschrieben. Dies deckt sich mit Ergebnissen aus der Literatur, die eine größere Vielfaltigkeit bei marinen Gastropoden konstatiert hat.

Eine Aufklärung über die Wirkweise der Bandbreite der Funktionen des Gastropoden-Schleims ist Gegenstand aktueller Forschung, z. B. für biotechnologische oder taxonomische Ansätze.

Für eine wirkliche Vergleichbarkeit der Ergebnisse hätten jedoch bedeutend mehr Schnitte angefertigt und diese auch korrekt kartiert werden müssen. Darüber hinaus wäre eine histochemische Komponente wichtig zur klaren Unterscheidung und Charakterisierung der Drüsenzelltypen und dem Inhalt ihrer Ausscheidungen gewesen. Das würde dann auch weitergehende Schlüsse zu der Funktion der Sekrete im Bezug zum jeweiligen Habitat ermöglichen.

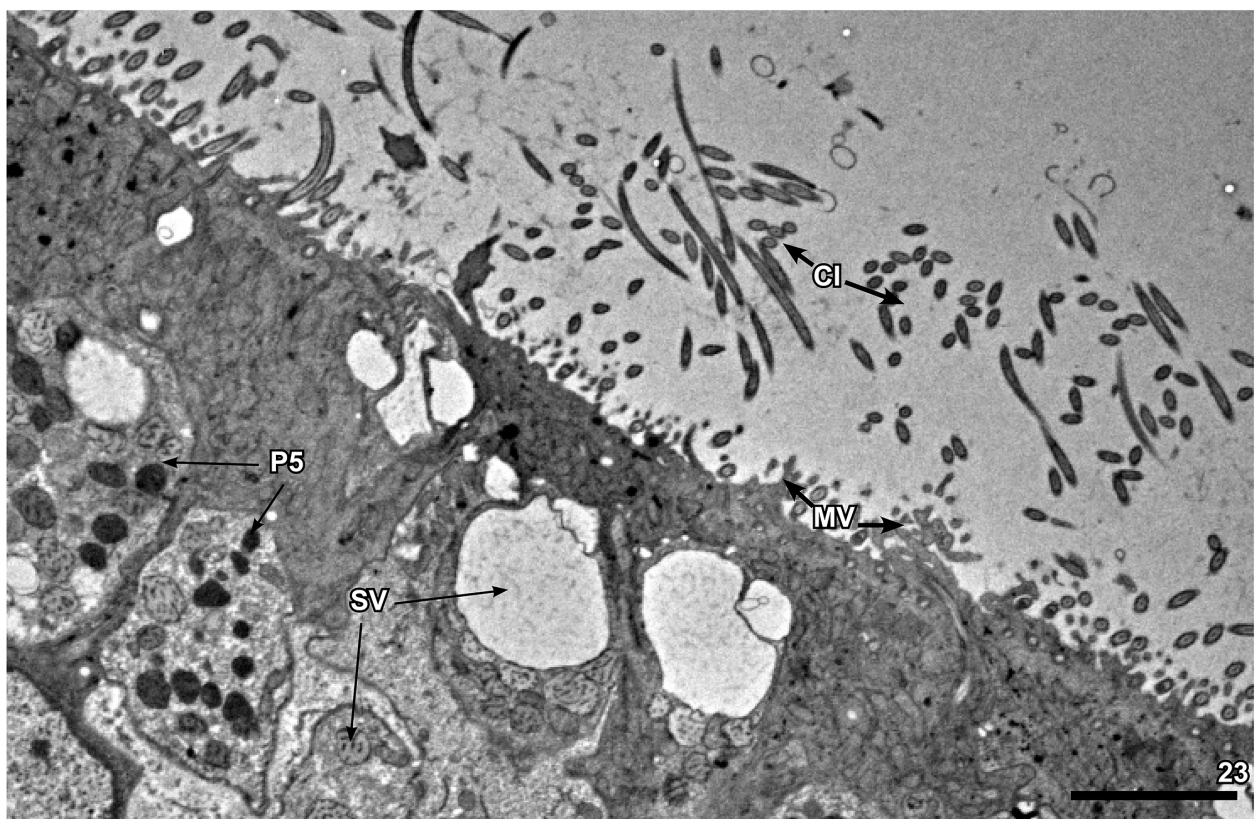
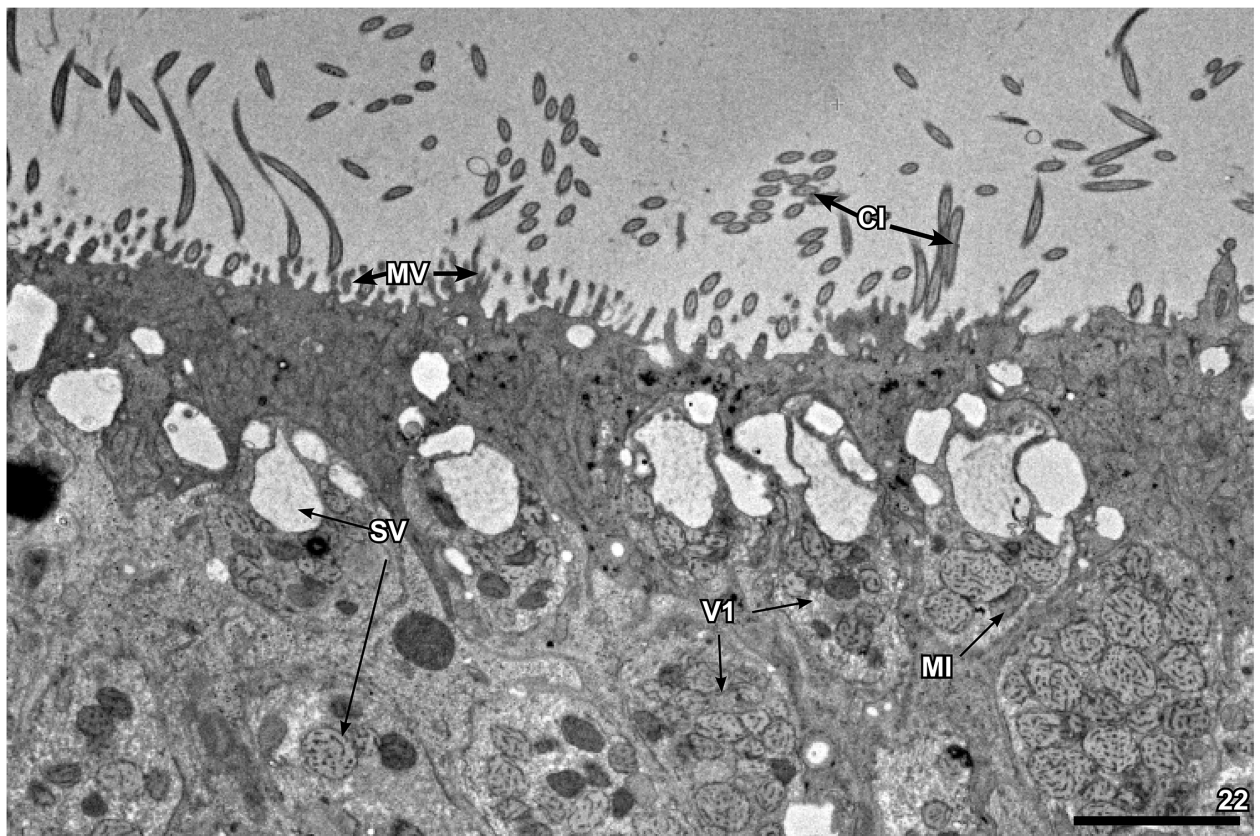


Abb. 22 & 23. Vergleichende Darstellung von TEM-Bildern der Epidermis vom Fuß von jeweils *V. viviparus* (22) und *S. divaricata* (23). Der Mikrovillisaum (MV) ist hier bei beiden reduziert und die Epidermis recht dicht mit langen Zilien (CI) besetzt. Einzelne Mitochondrien (MI) sind zwischen den Sekretvesikeln (SV) der Drüsenzellen erkennbar. Die als S5 (23) bzw. V1 (22) betitelten Drüsen sind ähnlich strukturiert und mit zwei Arten von Vesikeln gefüllt zu sein. Die erste ist apikal lokalisiert mit fast komplett elektronendurchlässigen Material gefüllt, ähnlich wie bei S4. Nur ganz schwach ist bei einigen Vesikeln eine granuläre Struktur zu erahnen. Die andere ist basal lokalisiert und ähnelt einem Mitochondrium, ist aber sehr unregelmäßig eingefaltet und heterogen elektronendicht. Die Maßstabsbalken entsprechen stets 2.5 µm.

Literatur

- R. A. Barr. (1927), „Some Notes on the Mucous and Skin Glands of *Arion ater*.“ Journal of Cell Science 1927 s2-71: 503-525; Online ISSN 1477-9137
- I. Bravo Portela, V. S. Martinez-Zorzano, I. Molist- Perez, and P. Molist García (2012), „Ultrastructure and Glycoconjugate Pattern of the Foot Epithelium of the Abalone *Haliotis tuberculata* (Linnaeus, 1758) (Gastropoda, Haliotidae)“, The Scientific World Journal, vol. 2012, Article ID 960159, <https://doi.org/10.1100/2012/960159>
- Crisp (2009), „Structure and Abundance of Receptors of the Unspecialized External Epithelium of *Nassarius Reticulatus* [Gastropoda, Prosobranchia]“, Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom Volume 51 Issue 4, <https://doi.org/10.1017/S0025315400018026>
- M. S. Davies and S. J. Hawkins (1998), „Mucus from marine molluscs,“ in Advances in Marine Biology V34, pp. 1–71, Academic Press, London, UK, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(08\)60210-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60210-2)
- M. Denny, (1983), „Molecular biomechanics of molluscan mucous secretions.“ Metabolic Biochemistry and Molecular Biomechanics. pp. 431–465 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-751401-7.50017-X>
- D. G. Emery, (1992), „Fine structure of olfactory epithelia of gastropod molluscs.“, Microsc. Res. Tech., 22: 307-324. doi:10.1002/jemt.1070220402
- M. C. Faccioni, Heuser, D. M. Zancan, C. Q. Lopes and M. Achaval, (1999), „The pedal muscle of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata): an ultrastructure approach.“, Acta Zoologica, 80: 325-337. doi:10.1046/j.1463-6395.1999.00029.x
- Fitch, D. D. (1975), „Oxygen consumption in the prosobranch snail *Viviparus contectoides* (Mollusca: Gastropoda)–I. Effects of weight and activity.“, Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 51(4): 815-820. [http://dx.doi.org/10.1016/0300-9629\(75\)90059-6](http://dx.doi.org/10.1016/0300-9629(75)90059-6)
- P. Glöer (2002) „Die Tierwelt Deutschlands. Mollusca I Süßwassergastropoden Nord- und Mitteleuropas Bestimmungsschlüssel, Lebensweise, Verbreitung.“, 2. neubearb. Aufl., 327 S., ConchBooks, Hackenheim 2002 ISBN 3-925919-60-0
- J. B. Graham; „Ecological and Evolutionary Aspects of Integumentary Respiration: Body Size, Diffusion, and the Invertebrata“, Integrative and Comparative Biology, Volume 28, Issue 3, 1 August 1988, Pages 1031–1045, <https://doi.org/10.1093/icb/28.3.1031>
- S. Greistorfer, W. Klepal, N. Cyran, A. Gugumuck, L. Rudoll, J. Suppan, J. von Byern (2017), „Snail mucus – glandular origin and composition in *Helix pomatia*“, Zoology, Volume 122, 2017, Pages 126-138, ISSN 0944-2006, <https://doi.org/10.1016/j.zool.2017.05.001>.
- J. M. Poutiers, (1998). „Gastropods in: FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes: The living marine resources of the Western Central Pacific“ Volume 1. Seaweeds, corals, bivalves and gastropods. Rome, FAO, 1998. page 399. ISBN 92-5-104051-6
- T. A. Ryder and I. D. Bowen (1977), „Endocytosis and aspects of autophagy in the foot epithelium of the slug *Agriolimax reticulatus* (Muller),“ Cell and Tissue Research, vol. 181, no. 1, pp. 129–141, 1977. PMID: 880619
- K. Simkiss (1988) , „Molluscan skin (excluding cephalopods),“ in The Mollusca: Form and Function, E. R. Trueman and M. R. Clarke, Eds., pp. 11–35, Academic Press, London, UK, 1988.
- L. C. Schlichter, „Ion relations of haemolymph, pallial fluid, and mucus of *Lymnaea stagnalis*“, Canadian Journal of Zoology, 1981, 59(4): 605-613, <https://doi.org/10.1139/z81-089>
- J. von Byern, N. Cyran, W. Klepal, L. Rudoll, J. Suppan, S. Greistorfer (2017) „The structure of the cutaneous pedal glands in the banded snail *Cepaea hortensis* (Müller, 1774).“, Journal of Morphology. 2018;279:187–198. <https://doi.org/10.1002/jmor.20763>
- W. Wenz (1923) „Gastropoda extramarina tertiaria“, Fossilium catalogus, 1 Animalium, 17 + 23: 1-1862, Berlin 1923 (S. 1807).

G. Wondrak, (2012). „Monotypic gland-cell regions on the body surface of two species of *Arion*: Ultrastructure and lectin-binding properties. “ Journal of Molluscan Studies, 78, 364–376. <https://doi.org/10.1093/mollus/ey024>